



PI-CLEAR
nucleic acid purification kit

Pi-Clear Nucleic Acid Purification Kit
DNA/RNA Viral

Instruções de uso

Research Use Only (RUO)

Índice

1.	Conteúdo e Armazenamento do Kit.....	2
2.	Envio e Armazenamento.....	2
3.	Uso do produto.....	2
4.	Finalidade.....	2
5.	Princípios de Ação.....	3
6.	Conteúdo do Kit.....	3
7.	Equipamentos e Insumos Operacionais.....	4
8.	Amostras Biológicas.....	4
9.	Cuidados Especiais.....	4
10.	Armazenamento de DNA/RNA Purificado.....	5
11.	Observações.....	5
12.	Preparo das Soluções de Trabalho.....	6
13.	Protocolo	6
13.1	Lise das Amostras.....	6
13.2	Ligação.....	7
13.3	Lavagem.....	8
13.4	Eluição.....	8

1. Conteúdo e Armazenamento do Kit

Tipos de kits: *Pi-Clear Nucleic Acid Purification Kit - DNA/RNA Viral* possui as seguintes apresentações:

Produto	Quantidade
Pi-Clear Nucleic Acid Purification Kit DNA/RNA Viral	50 extrações

2. Envio e Armazenamento

Todo o conteúdo do *Pi-Clear Nucleic Acid Purification Kit – DNA/RNA Viral* é enviado em temperatura ambiente (15 a 25 °C). Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

O armazenamento deve ser feito em temperatura ambiente (15 - 25°C).

Após ressuspendido é recomendado armazenar o reagente Carreador RNA (CR) a -20°C.

Após o primeiro uso, é recomendado armazenar o reagente Proteinase K (PK) a -20°C.

3. Uso do produto

Apenas para uso em pesquisa (RUO).

4. Finalidade

Produto desenvolvido para a extração e purificação de DNA/RNA viral de amostras de escarro, líquido cefalorraquidiano, *swab*, sêmen, sangue total, plasma e soro sanguíneos. Os ácidos nucleicos obtidos podem ser utilizados para variadas aplicações como PCR, RT-PCR, hibridização, sequenciamento, etc.

5. Princípios de Ação

O *Pi-Clear Nucleic Acid Purification kit – DNA/Rna Viral* foi desenvolvido para extração e purificação de DNA/RNA viral de amostras biológicas. O método utilizado é a extração por membrana de sílica. O processo é realizado em 4 etapas:

- 1) Lise celular: rompimento celular para liberação do DNA/RNA, na presença de sais de guanidina.
- 2) Ligação: ligação seletiva do ácido nucléico à membrana de sílica.
- 3) Lavagem: retirar as impurezas residuais, através de lavagens subsequentes.
- 4) Eluição: liberação do ácido nucleico da membrana de sílica, com água livre de DNase/RNase.

No final do processo, temos o DNA/RNA viral concentrado e com alta pureza.

6. Conteúdo do Kit

Os componentes incluídos no *Pi-Clear Nucleic Acid Purification Kit – DNA/RNA Viral* estão listados abaixo.

Componentes	Quantidade
Colunas – PB1	50 unidades (coluna + tubo de coleta)
Proteinase K – PK	300 µL
Carreador - CR	350 µg reagente liofilizado
Tampão de lise - TL	15 mL
Tampão de Lavagem 1 – TP1	50 mL
Tampão de Lavagem 2 – TP2	ATENÇÃO: Devem ser adicionados 48 mL de Etanol 96-100 % Volume Final: 60 mL
Água livre de Nuclease – PB3	15 mL
Tubo coletor (1,5 mL) – PB2	50 unidades

7. **Equipamentos e Insumos Operacionais**

Materiais contidos no kit:

- Reagentes descritos no item (6), “Conteúdo do Kit”.
- Instrução de uso (manual).

Materiais necessários, mas não contidos no kit:

- A. Etanol 96-100%;
- B. Micropipetas e ponteiros estéreis com filtro (0,5 10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL);
- C. Microtubos estéreis, livres de RNase e DNase;
- D. Microcentrífuga;
- E. Agitador Vórtex;
- F. Equipamento de Proteção Individual (luvas, jaleco, óculos);

8. **Amostras Biológicas**

Kit para extração de DNA/RNA viral de amostras biológicas de escarro, líquido cefalorraquidiano, swab, semen, sangue total, plasma e soro sanguíneos. As amostras devem ser coletadas e armazenadas de acordo com as recomendações do laboratório para testes moleculares.

9. **Cuidados Especiais**

- Procedimentos de biologia molecular, tais como a extração de ácidos nucléicos, transcrição reversa, amplificação e detecção, requerem pessoal qualificado para evitar o risco de resultados errados, especialmente devido à degradação do material contido nas amostras ou contaminação da amostra por produtos de amplificação.
 - Utilize materiais plásticos estéreis e descartáveis.
 - Use apenas ponteiros e tubos de microcentrífuga para pipetas estéreis e descartáveis, livres de RNase e DNase.
 - Use luvas descartáveis, sem talco, ao manusear reagentes e amostras
-

biológicas, para evitar a contaminação por DNase/RNase da superfície da pele. Troque as luvas com frequência, em especial à medida que o protocolo progride de material bruto para material purificado.

- Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de melhores resultados.
- Recomendamos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente.
- Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar a FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos) disponibilizada no site www.pi-biotech.com.
- O Tampão de Lise contém sais de guanidina, que é prejudicial quando em contato com a pele, ou quando é inalado ou ingerido.
- Não adicione água sanitária (hipoclorito de sódio) ou soluções ácidas diretamente em resíduos de preparação de amostras, pois devido à presença de sais de guanidina podem ocorrer a formação de gases tóxicos e componentes reativos.

10. Armazenamento de DNA/RNA Purificado

Armazene o DNA/RNA viral purificado eluído a -20 °C, se for utilizar o material dentro de algumas horas de isolamento. Para armazenamento de longo prazo, armazene o DNA/RNA viral purificado a -70°C.

11. Observações

- A quantidade de tampão de lise necessária pode variar conforme a quantidade de material inicial, bem como com o tipo de amostra.
 - Volume de eluição: o rendimento de DNA/RNA depende do tipo, tamanho e qualidade da amostra. Dependendo do seu rendimento esperado e da sua amostra, use entre 30 µL– 100 µL de Água livre de DNase/RNase para cada eluição.
-

12. Preparo das Soluções de Trabalho

Preparar o Tampão de Lavagem 2 (TP2) e o carreador (CR), conforme mostrado na tabela abaixo:

Reagente	Preparo
Tampão de Lavagem 2 (TP2)	Adicionar 48 mL de etanol 96-100%. Homogeneizar a solução.
Carreador (CR)	Adicionar 350 µL de água livre de Nuclease (PB3)

13. Protocolo

13.1 *Lise das Amostras*

Realizar as etapas de lise da amostra, conforme tipo de amostra:

Tipo de Amostra	Procedimento
Plasma e Soro sanguíneos, Líquido Cefalorraquidiano, sêmen	<ul style="list-style-type: none"> - Pipetar 200 µL de amostra à temperatura ambiente, em microtubo limpo, estéril e livre de DNase e RNase; - Adicionar 5 µL de Proteinase K (PK) ao microtubo contendo a amostra e homogeneizar. - Em seguida, adicionar 200 µL de Tampão de Lise (TL) e homogeneizar vigorosamente em vórtex (10-15 segundos). - Prosseguir para a etapa de Ligação.
Sangue total	<ul style="list-style-type: none"> - Pipetar 200 µL de amostra à temperatura ambiente, em em

	<p>microtubo limpo, estéril e livre de DNase e RNase.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Adicionar 5 µL de Proteinase K (PK) ao microtubo contendo a amostra e homogeneizar. - Em seguida, pipetar 200 µL de Tampão de Lise (TL) e homogeneizar vigorosamente em vórtex (10-15 segundos). - Prosseguir para a etapa de Ligação.
<p style="text-align: center;">Swab em meio de transporte / estabilizante</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Pressionar o swab com a ponteira no meio de transporte para retirar o material biológico (pode ser centrifugado em um breve <i>spin</i>). - Descartar o swab e pipetar 200 µL do meio de transporte contendo o material biológico em um microtubo limpo, estéril e livre de DNase/RNase. - Adicionar 5 µL de Proteinase K (PK) ao microtubo contendo a amostra e homogeneizar. - Em seguida, pipetar 200 µL de Tampão de Lise (TL) e homogeneizar vigorosamente em vórtex (10-15 segundos). - Prosseguir para a etapa de Ligação.

13.2 Ligação

A - Adicionar 5,6 µL de Carreador (**CR**) preparado e homogeneizar.

B - Incubar por 3 minutos a temperatura ambiente (18-25°C).

C - Adicionar 200 µL de Etanol (96-100%) a cada microtubo contendo amostra e homogeneizar em vórtex (10-15 segundos).

D - Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente (18-25°C).

- E - Transferir 700 µL da amostra lisada para a coluna de sílica (**PB1**).
- F - Centrifugar por 3 minutos a 4.000 x g.
- G - Descartar o filtrado.
- H - Caso necessário, repetir os passos **E-G** até esgotar toda a amostra.

13.3 Lavagem

- I - Adicionar 700µL do reagente Lavagem 1 (**TP1**) a cada Coluna contendo amostra.
- J - Centrifugar por 1 minuto a 11.000 x g.
- K - Adicionar 500µL do reagente Lavagem 2 (**TP2**) preparado.
- L - Centrifugar por 1 minuto a 11.000 x g.
- M - Descartar o filtrado.
- N - Repetir os passos **K-M**.
- O - Centrifugar por 2 minutos a 12.000 x g, para secar totalmente a coluna.
- P - Descartar o tubo de coleta e transferir a coluna para um tubo coletor (**PB2**).

13.4 Eluição

- Q - Adicionar 30~100 µL de Água livre de Nuclease (**PB3**) diretamente no centro da membrana.
- R - Incubar a temperatura ambiente por 3 minutos.
- S - Centrifugar por 3 minutos a ≥ 15.000 x g, e descartar a Coluna.
- T - Armazenar o DNA/RNA eluído a -20°C, caso não seja utilizado imediatamente. Para longos períodos de armazenamento é recomendado estocar o DNA/RNA à -70°C.